

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGIA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Master en Ciencias Odontológicas

Trabajo Fin de Master

**Estudio de la expresión diferencial de proteínas de
Fusobacterium nucleatum en biofilm vs. en estado
planctónico**

Luca Boggione

Tutor: Profesor Doctor David Herrera González

Madrid, 2017

Índice

Resumen.....	2
1. Introducción	4
2. Objetivos.....	13
3. Material y Métodos.....	14
3.1 Cultivo y cepa bacteriana.....	14
3.2 Formación del biofilm monoespecie de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	14
3.3 Recuperación de las bacterias presentes en el biofilm y en el cultivo planctónico.....	15
3.4 Extracción y solubilización de las proteínas bacterianas.....	15
3.5 Cuantificación de las muestras proteicas.....	17
3.6 Sistema 2D-DIGE™.....	18
3.6.1 Diseño experimental DIGE™.....	18
3.6.2 Marcaje con fluorocromos.....	19
3.7 Electroforesis bidimensional.....	19
3.7.1 Primera dimensión.....	19
3.7.2 Equilibrado tiras.....	20
3.7.3 Segunda dimensión.....	21
3.7.4 Escaneado de los geles.....	21
3.7.5 Análisis de imagen.....	21
3.7.6 Filtro estadístico de los datos.....	22
3.8 Identificación de las proteínas diferenciales.....	23
3.8.1 Tinción de geles con Coomassie coloidal.....	23
4. Resultados.....	25
4.1 Desarrollo del biofilm y el cultivo planctónico.....	25
4.2 Estudio de la expresión diferencial.....	26
4.3 Identificación de las proteínas de interés (POI).....	33
5. Discusión.....	35
6. Conclusión.....	38
7. Bibliografía	39

Resumen

Introducción: Las células bacterianas pueden crecer formando biofilms o en estado de vida libre planctónico. En el modo de crecimiento de biofilm, los microorganismos muestran una mayor capacidad virulenta, un aumento en la resistencia a compuestos antimicrobianos, presentan una mejor respuesta al estrés ambiental y desarrollan numerosos mecanismos de respuesta inmunológica frente al huésped.

Objetivo: El propósito de este estudio ha sido el análisis de la expresión diferencial de proteínas de *Fusobacterium nucleatum* DSM20482 cuando está formando biofilm respecto a cuando está en estado planctónico. De esta forma, se pueden encontrar posibles blancos para futuras terapias que permitan bloquear o mermar la incorporación de bacterianas patógenas a la placa bacteriana, e identificar proteínas que se expresan exclusivamente en la fase de biofilm claramente implicadas en producción de una respuesta inmunogénica en el huésped y que podrían utilizarse en una primera aproximación como biomarcadores en las enfermedades periodontales.

Material y Métodos: Para el estudio de las proteínas diferenciales de *F. nucleatum* se desarrolló el biofilm de esta especie sobre portaobjetos (*slides*) cubiertos de hidroxiapatita con una concentración bacteriana de 10^7 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL y 24 horas de incubación. El cultivo planctónico se realizó en las mismas condiciones. Después de recuperar las bacterias que están en el biofilm y en el cultivo planctónico, se procedió a la ruptura de la célula con un tampón adecuado y a la extracción de las proteínas bacterianas en ambos estados. Posteriormente, se limpiaron las muestras para eliminar impurezas que interfiriesen en la electroforesis bidimensional, se solubilizaron las proteínas y se cuantificaron por el método

Bradford. Para comprobar la cantidad y calidad de las muestras proteicas se llevó a cabo la separación de las proteínas por electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. Cuando se obtuvo la suficiente cantidad de proteína, haciendo grupos de muestras, se procedió al marcaje de éstas utilizando la tecnología 2D-DIGE™ (*2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*) y a la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional. Los geles se escanearon con el escáner Typhoon™ 9400 y las imágenes se analizaron con el software DeCyder™ v6.5. Las proteínas diferenciales se identificaron por espectrometría de masas.

Resultados y Conclusiones: Se observaron 68 *spots* que se expresaban diferencialmente. De estos 68, se han identificado 26 proteínas que se sobreexpresan cuando está en estado biofilm y 18 que se reprimen. Es importante destacar que las proteínas que se sobreexpresan son proteínas implicadas en metabolismo y en biosíntesis de macromoléculas, transportadores de tipo ABC y proteínas de función desconocida. El estudio de estas proteínas puede ayudar a entender la formación del biofilm en *F. nucleatum* y su implicación en la virulencia de la bacteria.

Introducción

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica que aparece como resultado de una infección polimicrobiana compleja en individuos susceptibles (Loe y cols., 1965; Lindhe y cols., 1975; Lindhe y Rylander, 1975). Esta enfermedad conduce a la destrucción de los tejidos periodontales (encía, cemento, ligamento periodontal y hueso) como consecuencia de una alteración de la homeostasis entre la microbiota subgingival y las defensas del huésped (Armitage, 2005; Sanz y van Winkelhoff, 2011). Recientemente, la periodontitis severa ha sido considerada como la sexta patología más común a nivel global (Frencken y cols., 2017). Su prevalencia se estima desde un 47% en adultos con más de 30 años, hasta un 85% en sujetos mayores de 65 años (Eke y cols., 2012; Chung y cols., 2011).

No obstante, en la etiología multifactorial de la periodontitis, los depósitos bacterianos tienen un papel fundamental en su desarrollo (Page y Kornman, 1997). Estos depósitos, comúnmente llamados placa dental, forman una biopelícula bacteriana sobre la superficie del diente, en la zona del margen gingival, que provoca inicialmente una respuesta inflamatoria local, denominada gingivitis. En individuos susceptibles, la acumulación prolongada de la placa dental causa una inflamación que pueda resultar en la profundización gradual del surco gingival (denominado "bolsa periodontal") y en la destrucción concomitante del ligamento periodontal y el hueso alveolar, la condición patológica denominada periodontitis.

Debido al papel principal de las bacterias en las enfermedades periodontales (Socransky y cols., 1998), desde hace años la investigación se ha centrado en el conocimiento de las complejas estructuras bacterianas y de las interacciones entre

ellas, con el fin de entender el desarrollo de esta enfermedad y encontrar una posible terapia contra sus avances.

La mayoría de los trabajos que hay sobre las propiedades y el metabolismo de las bacterias orales son estudios de cultivos puros de especies individuales que crecen en probeta; esta forma de estudiar el comportamiento de las bacterias era el más conveniente y fiable. Sin embargo, el crecimiento de las poblaciones bacterianas en suspensión en medio líquido no es la manera normal de crecimiento de éstas en la cavidad oral, ya que aquí los microorganismos se organizan generalmente en biofilms. Con el termino biofilm se entiende “una comunidad microbiana indefinida que coloniza una superficie de un material duro, como la superficie de los dientes, y que está embebida en una matriz rica en polímero” (Wilderer y Charaklis, 1989); la placa dental es un ejemplo de biofilm.

El desarrollo de nuevas tecnologías en el campo de la investigación microbiana, como la microscopía confocal y otras técnicas microscópicas avanzadas, así como los enfoques moleculares para identificar y cuantificar las especies bacterianas no cultivables, ha permitido una revolución en la concepción de la placa dental y su estudio. Se ha observado, por ejemplo, que la mayoría de las bacterias no sobreviven en la naturaleza como organismos unicelulares pero sí lo hacen como biofilms o biopelículas (Jenkinson, 2014) y que algunas de las enfermedades sistémicas u orales, como la caries o la periodontitis, son fuertemente dependientes de las combinaciones de estas bacterias en la cavidad oral (Zarco y cols., 2012). Otros estudios han establecido que, cuando las células forman un biofilm, la expresión del genoma bacteriano puede alterarse notablemente, lo que provoca que muchos organismos expresan un fenotipo radicalmente diferente tras la adhesión a una superficie (Marsh y cols., 2005). Además, la unión de las bacterias a receptores

específicos del huésped también puede provocar cambios significativos en los patrones de expresión génica del mismo huésped.

La estructura del biofilm es, por lo tanto, el resultado del desarrollo de una comunidad microbiana dinámica y muy organizada que presenta una amplia gama de interacciones físicas, metabólicas y moleculares. En esta compleja red, la cooperación entre las diferentes especies bacterianas proporciona diferentes ventajas potenciales para los organismos que la componen (Caldwell y cols., 1997; Shapiro y cols., 1998; Marsh y Bowden, 2000). Tales ventajas incluyen: un amplio rango de hábitats para el crecimiento, un aumento de la eficiencia y diversidad metabólicas, una mejoría en la tolerancia a estrés ambiental, agentes antimicrobianos (Arciola, 2005; Halliman, 2004; Holo y cols., 2004) y factores de defensas del huésped (Costerton, 1999); y por último, un aumento en la capacidad de causar enfermedad, concepto definido como sinergia patogénica.

Los microorganismos que se encuentran en biofilms multiespecies no están distribuidos al azar sino que están organizados a nivel espacial y funcional. Los biofilms dentales se forman a través de una secuencia ordenada de eventos, los cuales resultan en una biopelícula microbiana estructuralmente y funcionalmente organizada. (Socransky y Haffajee, 2002; Marsh y cols., 2005; Kolenbrander y cols., 2006; Marsh y cols., 2011).

Las distintas etapas en la formación de la biopelícula dental incluyen:

1. La formación de la película adquirida: una capa compuesta de varias glicoproteínas salivares (mucinas) y anticuerpos. Esta película altera la carga eléctrica y la energía liberada desde la superficie, aumentando así la eficiencia de la adhesión bacteria.

2. La adhesión reversible entre la superficie de la célula microbiana y la película, permitida solo a un limitado número de especies bacterianas llamadas colonizadores primarios.

3. Un aumento de interacciones permanentes entre moléculas específicas de la superficie celular microbiana (adhesinas) y moléculas complementarias (receptores) presentes en la película.

4. La co-adherencia, en la que los colonizadores secundarios se adhieren a los receptores de las bacterias ya presentes en la superficie glicoproteica (Kolenbrander y cols., 2010), lo que lleva a un aumento en la diversidad microbiana.

5. La multiplicación de las células, lo que lleva a un aumento en la biomasa y la síntesis de exopolímeros para formar la matriz del biofilm (maduración placa).

6. El desprendimiento de células unidas para promover la colonización en otros lugares.

La bacteria gram-negativa anaerobia *Fusobacterium nucleatum* (Baumgartner y cols., 1992) es considerada una especie muy importante en el desarrollo y en el proceso de maduración de la placa dental (Jorth y cols., 2014; Kolenbrander y London, 1993), y su contribución es muy importante en las modificaciones estructurales y metabólicas de ésta. *F. nucleatum* puede unir numerosas especies bacterianas en la cavidad oral, actuando como un relevante organismo “puente” entre las especies colonizadoras primarias y tardías (Guo y cols., 2014; Kolenbrander y cols., 1989; Kolenbrander y cols., 1995). Desde el punto de vista metabólico, *F. nucleatum* es un factor clave en la producción del butirato (Jorth y cols., 2014), que estudios previos han relacionado con el desarrollo de la periodontitis (Niederman y cols., 1997).

F. nucleatum es una especie bacteriana del género *Fusobacterium*, que pertenece a la familia de las *Bacteroidaceae*. El nombre *Fusobacterium* tiene su origen en *fuscus*, un huso, y *bacterion*, una pequeña barra; el término *nucleatum* deriva de la estructura nucleada que se ha visto en las preparaciones para el microscopio electrónico por la presencia de los gránulos intracelulares (Hofstad, 1981). Esta especie bacteriana es la más frecuentemente detectada en los cultivos de placa subgingival, en presencia y también en ausencia de la enfermedad (Dzink y cols., 1985, 1988). Sin embargo, se ha demostrado que su presencia es mucho mayor en localizaciones patológicas respecto a las sanas (Bolstad y cols., 1996); su prevalencia es mayor en los pacientes con periodontitis (Papapanou y cols., 2000; Socransky y cols., 2002) y en casos de abscesos periodontales (Herrera y cols., 2000); y también se encuentra en menor cantidad después de una terapia periodontal efectiva (van der Velden y cols., 2003; Haffajee y cols., 2006).

F. nucleatum codifica varias adhesinas necesarias para las interacciones interespecies, incluyendo Fap2 y RadD (Kaplan y cols., 2010). Fap2 es una adhesina sensible a galactosa, que ha sido implicada en la interacción entre *F. nucleatum* y el patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* (Copenhagen-Glazer y cols., 2015); y RadD es una adhesina sensible a arginina necesaria para la interacción entre *F. nucleatum* y múltiples miembros Gram positivos de la placa dental, incluyendo los colonizadores tempranos *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus gordonii* (Kaplan y cols., 2009).

También, *F. nucleatum* se une a una variedad de células de mamífero, como células epiteliales y endoteliales, polimorfonucleares (PMNs), monocitos, eritrocitos, fibroblastos, y células NK, así como moléculas del huésped tales como macromoléculas salivales, proteínas de la matriz extracelular, la IgG humana, y

cadherinas (Han y cols., 2000; Han y cols., 2004; Han y cols., 2011; Bachard y cols., 2006). La adhesión y la invasión son mecanismos esenciales para la colonización, la difusión, la evasión de defensa del huésped, y la inducción de respuestas inmunitarias.

Esta bacteria provoca diferentes respuestas del huésped (Han y cols., 2011). Induce β -defensinas a partir de células epiteliales orales a través de la proteína Fad-I humana (Gupta y cols., 2010), estimula los factores que predisponen a la aterosclerosis mediante GroEL (Kostic y cols., 2012) y activa la apoptosis de los linfocitos por Fap2 y RadD (Kaplan y cols., 2010). *F. nucleatum* es un potente estimulador de citoquinas inflamatorias, interleucina-6, interleucina-8 y factor de necrosis tumoral (Han y cols., 2000, Park y cols., 2014). También la unión de *F. nucleatum* a las células NK activa la respuesta inflamatoria implicada en la enfermedad periodontal (Chaushu y cols., 2012). Las infecciones periodontales son procesos complicados que requieren la comprensión tanto de la flora microbiana y de los componentes inmunológicos del huésped, así como la interacción entre estos dos factores.

F. nucleatum también, además, de ser conocido por su capacidad de adherirse a diversas bacterias patógenas (Kolenbrander y cols., 1989), tiene la capacidad de reducir los niveles de oxígeno, ayudando así a los organismos menos aerotolerantes como *P. gingivalis* (Bradshaw y Marsh, 1998).

La secuenciación del genoma de un alto número de especies ha conducido a lo que se llama la era de la post-genómica. En 1994, Wilkins introdujo el término de proteoma como equivalente lingüístico al concepto del genoma (Sorimachi y cols., 1989). El proteoma se define como el conjunto de proteínas que se expresan a partir

de un genoma. La Proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica el proteoma expresado en un organismo en determinados momentos puntuales y bajo condiciones concretas establecidas, cómo en la enfermedad, en los factores ambientales y fisiológicos como la edad, el estrés, y los agentes tóxicos y/o fármacos (Ono y cols., 2004; Kinbara y cols., 1998).

La electroforesis bidimensional es un método ampliamente utilizado para el análisis de mezclas complejas de proteínas extraídas de células, tejidos y otras muestras biológicas. Esta técnica separa las proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes: primero en función de su punto isoelectrico, y segundo, en función de su masa molecular. Para el estudio de la expresión diferencial de proteínas se ha recurrido al sistema 2D-DIGE™ (*Two-Dimensional Difference In-Gel Electrophoresis*) que permite la cuantificación del cambio relativo de expresión de cada proteína, pudiendo así conocer las diferencias fisiológicas entre los dos estados que se están comparando (biofilm/planctónico). Con esta técnica se realiza un marcaje de los diferentes extractos proteicos con distintos fluorocromos y se realiza la separación mediante electroforesis bidimensional (Tonge, 2001). En el sistema 2D-DIGE, se utilizan los fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2 (*CyDye DIGE Fluor minimal dyes*) que han sido diseñados con el mismo peso molecular y la misma carga para asegurar que las proteínas comunes de las muestras proteicas tengan la misma movilidad relativa en un gel bidimensional (Tonge, 2001). Los fluorocromos tienen un grupo éster reactivo NHS y están diseñados para formar un enlace covalente con el grupo ϵ -amino de las lisinas en las proteínas a través de un enlace tipo amida. El colorante se añade a la proteína de modo que la cantidad de fluorocromo se restringe en la reacción de marcaje. La proporción utilizada asegura que el fluorocromo marque aproximadamente un 1-2% de los residuos de lisina, de tal manera que cada proteína

marcada lleve sólo una molécula de colorante y sea visualizada como una mancha proteica individual. Por lo tanto, los fluorocromos sólo marcan una pequeña proporción de la proteína total de una muestra y por eso este tipo de marcaje se ha llamado marcaje “mínimo”. El aminoácido lisina en las proteínas lleva una carga intrínseca de +1 a pH neutro o ácido. Los fluorocromos también llevan una carga +1 que, cuando se asocian a lisina, sustituyen la carga +1 de la lisina por la suya propia, asegurando que el punto isoeléctrico de la proteína no se altera de forma significativa.

Dos de los fluorocromos (Cy3 y Cy5) se utilizan para marcar las muestras de las diferentes condiciones a comparar, mientras que el Cy2 se usa para marcar un estándar interno compuesto de una mezcla de todas las muestras que componen el experimento, y que se procesa en cada uno de los geles. Este sistema se ha desarrollado para disminuir la variación intrínseca entre geles, que es una de las limitaciones del estudio clásico de expresión diferencial en el que cada muestra a comparar se separa en un gel diferente. Además, el marcaje fluorescente mejora la cuantificación y tiene un rango dinámico lineal de cuatro o cinco órdenes de magnitud en comparación con otros métodos de tinción. Gracias a que cada uno de los fluorocromos se excita y emite a una longitud de onda diferente, la imagen de cada una de las condiciones puede adquirirse de manera individualizada, excitando la muestra en las longitudes de ondas específicas para cada uno de los fluorocromos (Figura 1). Todas estas ventajas, junto con el análisis estadístico que se aplica, hace esta técnica muy adecuada para el estudio de la expresión diferencial de proteínas.

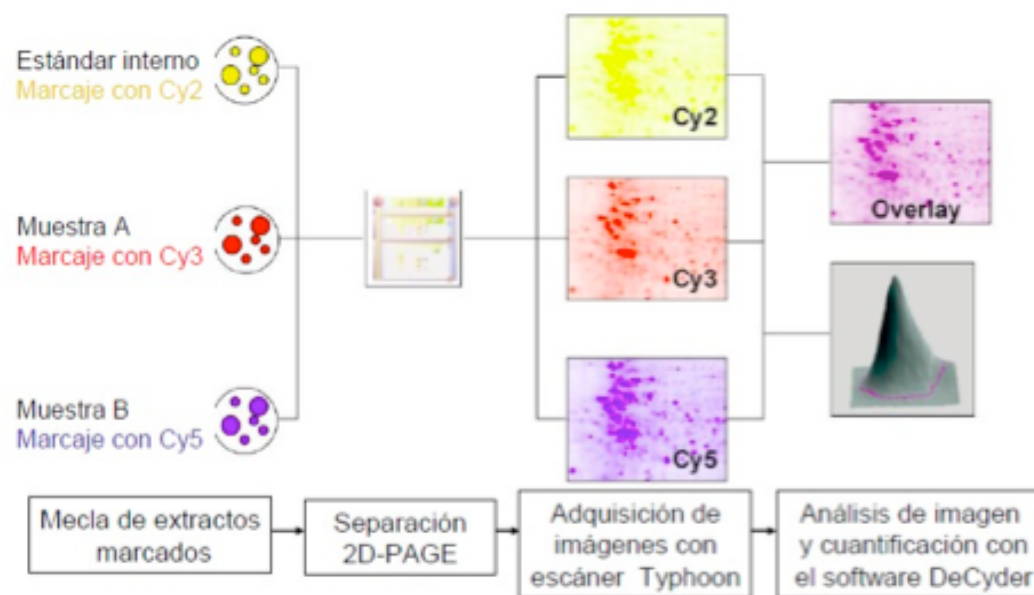


Figura 1. Flujo de trabajo del sistema 2D-DIGE™

Objetivos

El propósito de este estudio ha sido el estudio de la expresión diferencial de proteínas de *F. nucleatum* cuando está formando biofilm respecto a cuando está en estado planctónico.

Objetivos Específicos

- Buscar proteínas que se expresen diferencialmente en el biofilm respecto al estado planctónico, como posibles blancos para futuras terapias que permitan bloquear o mermar la incorporación de bacterianas patógenas a la placa bacteriana;
- Validar funcionalmente algunas de estas proteínas diferenciales para analizar el papel de éstas en el biofilm y así encontrar posibles marcadores de las enfermedades periodontales.

Materiales y Métodos

Cultivo y cepa bacteriana

La cepa utilizada en este trabajo ha sido *Fusobacterium nucleatum* DSM20482. La bacteria se cultivó en placas de medio Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) suplementado con un 5% de sangre de caballo (Oxoid), Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L) en condiciones de anaerobiosis (10% H₂, 10% CO₂ y balance N₂) a 37°C. Para el crecimiento en biofilm y en estado planctónico se utilizó el medio BHI modificado [medio Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company; EE.UU.), suplementado con Mucina (2,5 g/L), Extracto de levadura (1,0 g/L), Cisteína (0,1 g/L), Bicarbonato sódico (2,0 g/L), Hemina (5 mg/L), Menadiona (1 mg/L) y 0,25% de ácido glutámico (v/v)] en condiciones de anaerobiosis a 37°C.

Formación del biofilm monoespecie de *Fusobacterium nucleatum*

El biofilm monoespecie se desarrolló sobre unos cristales (*slides*) de 7.5 cm x 2.5 cm cubiertos de hidroxiapatita (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, EE.UU.) (Figura 2) en una placa Petri. Por otro lado, el cultivo planctónico se incubó en unos tubos de plástico de 50 mL tipo Falcon.

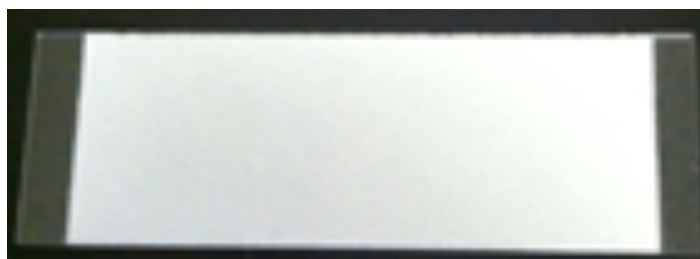


Figura 2. Slide cubierto de hidroxiapatita

En ambos casos, a partir de un cultivo bacteriano de *F. nucleatum* en fase exponencial en medio BHI modificado, se ajustó la concentración bacteriana a 10^7 ufc/mL y se incubó en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 24 horas.

Recuperación de las bacterias presentes en el biofilm y en el cultivo planctónico

Para recuperar las bacterias que forman el biofilm en esta superficie (*slide*) se procedió de la siguiente forma: se extrajo el *slide* de una placa de cultivo Petri y se añadió 1 mL de PBS (*Phosphate Buffer Saline*) raspando el biofilm con un rascador de células (*scraper*), recogiendo la suspensión, añadiéndola a un eppendorf y guardando a -20°C. Para recuperar las bacterias en estado planctónico, se centrifugó la suspensión bacteriana a 9000 rpm 10 min y el pellet se guardó a -20°C.

Extracción y solubilización de las proteínas bacterianas

El siguiente paso fue la extracción de las proteínas bacterianas que se encontraban en el biofilm y en las células planctónicas; y para ello, había que proceder a la rotura de la célula en un tampón adecuado para evitar la lisis de las proteínas, la agregación proteica y favorecer la resuspensión de éstas. Primero se centrifugaron las muestras de biofilm a 13000 rpm 5 minutos a 4°C para retirar el PBS y añadir el buffer adecuado (250 µL) para proceder a la extracción proteica. En el caso de las muestras de planctónico, se añadió al pellet el mismo buffer (3.5 mL) que se utilizó con las muestras de biofilm. Este buffer estaba compuesto de lo siguiente: PBS + 100 mM Dithiothreitol (DTT, agente reductor) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) + 100 mM Fluoruro de metil fenil sulfonato (PMSF, inhibidor de

proteasas) (Sigma, St. Louis, MO, USA) + mezcla nucleasa (GE Healthcare) + cocktail inhibidor proteasas 10X (Roche Diagnostic GmbH; Mannheim, Alemania).

Para romper y liberar el contenido celular, el método empleado fue la sonicación que consiste en la rotura de las membranas bacterianas producida por ondas de ultrasonido mediante un sonicador ultrasónico de punta (con 20 pulsos discontinuos de 10s y 1 pulso continuo de 10s). Posteriormente, se centrifugó para descartar el “debris” celular.

Una vez que se procedió a la ruptura de la membrana bacteriana y a la extracción proteica, debía realizarse la limpieza de la muestra para eliminar posibles restos de sales, detergentes, lípidos e impurezas varias, que van a interferir en el proceso de separación proteica por isoelectroenfoque que tiene lugar en la realización de los geles bidimensionales. Se observó que, tanto para las proteínas del biofilm como para las proteínas de las células planctónicas, el proceso óptimo era la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) (Sigma) al 10% y el lavado del pellet con el buffer de lavado de un kit de limpieza de la muestra (2D Clean-Up™ Kit, GE Healthcare).

Las proteínas precipitadas debían ser resuspendidas y solubilizadas adecuadamente para poder ser separadas mediante los geles bidimensionales. Para resuspenderlas se empleó el buffer de solubilización DIGE™ (25mM Tris (GE Healthcare), 7M urea (GE Healthcare), 2M tiourea (GE Healthcare), 4% CHAPS (detergente zwitterónico) (GE Healthcare)) y se agitaron de forma constante durante 2h y media a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un paso intermedio de resuspensión en un baño de ultrasonidos (para favorecer la solubilización): las muestras se sometieron a ultrasonidos cuatro veces durante 5 minutos (poniéndolas

en hielo cada vez). Posteriormente, las muestras se centrifugaron para eliminar todo aquello que no se había solubilizado.

Cuantificación de las muestras proteicas

El siguiente paso se correspondía con la cuantificación proteica de las muestras. Para ello, se utilizó el método Bradford que consistía en añadir el reactivo Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU) a las muestras, incubar y medir la absorbancia a 595 nm empleando una curva patrón con albúmina de suero bovina (BSA) de concentración conocida.

Tras cuantificar las muestras, se procedió a la verificación mediante control de carga en un gel SDS-PAGE (condiciones desnaturalizantes). Para ello se tomaron 20 µg de cada una de las muestras y se les añadió un volumen igual de tampón de carga (2x), que contenía 100mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS (dodecil sulfato sódico), 20% glicerol, azul de bromofenol y 200mM DTT. Las muestras se desnaturalizaron (incubando 5 min a 95°C y 2 min en hielo) y se centrifugaron a 13000 rpm 2 min. Para la electroforesis SDS-PAGE, se utilizó el sistema Mini Protean II (Bio-Rad). Los geles de poliacrilamida se hicieron al 10% y el patrón de pesos moleculares que se empleó fue Precision Plus Protein Standards Dual Color (Bio-Rad). El tampón de electroforesis que se utilizó contenía Tris 25mM, glicina 250mM y SDS 0.1%. El gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 (0.25% azul de Coomassie R-250, 50% metanol, 9% ácido acético, 41% agua MilliQ (agua de máxima pureza)) durante al menos 2 horas y se destiñó con la solución de desteñido (40% metanol, 7% ácido acético, 53% agua MilliQ) hasta que se observaron las bandas proteicas correspondientes de biofilm y de estado planctónico de *F. nucleatum*.

Sistema 2D-DIGE™

Diseño experimental DIGE™

Posteriormente, se procedió a la preparación de las muestras para su marcaje ajustando el pH a 8.5, utilizando tiras indicadoras de pH (Sigma) y una solución de NaOH 1N para modificarlo.

Se obtuvieron 4 réplicas biológicas de cada una de las condiciones (biofilm y planctónico) a estudiar. Se marcaron las muestras a comparar en cada gel con los fluorocromos Cy3 y Cy5 (reconstituidos en N,N-dimetilformamida; Sigma), y el Cy2 (reconstituido en N,N-dimetilformamida; Sigma) se utilizó para marcar un estándar interno, que se incluyó en todos los geles y que se obtuvo mezclando la misma cantidad de proteína de cada una de las muestras que formaban parte del experimento. Las 4 réplicas biológicas de cada condición se distribuyeron en los geles de forma aleatoria para poder obtener resultados comparativos estadísticamente significativos. Por lo tanto, el diseño experimental fue el siguiente:

Pool1 Biofilm Cy3 + Pool4 Planctónico Cy5 + Estándar interno Cy2

Pool2 Biofilm Cy5 + Pool3 Planctónico Cy3 + Estándar interno Cy2

Pool3 Biofilm Cy3 + Pool1 Planctónico Cy5 + Estándar interno Cy2

Pool4 Biofilm Cy5 + Pool2 Planctónico Cy3 + Estándar interno Cy2

Marcaje con fluorocromos

Para el marcaje de las muestras se siguieron las instrucciones del kit de marcaje mínimo *CyDye DIGE Fluor minimal dyes* (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante (Figura 3). Se marcaron 50 μg de proteína de cada una de las muestras con 400 pmol de fluorocromo (*CyDye DIGE Fluor minimal dyes*, GE Healthcare), y se dejó actuar 30 minutos en hielo y en oscuridad donde los fluorocromos se unen a 1-2% de las lisinas de las proteínas; tras este tiempo se añadió 1 μL de lisina 10mM para parar la reacción y se dejó 15 minutos en hielo y en oscuridad.

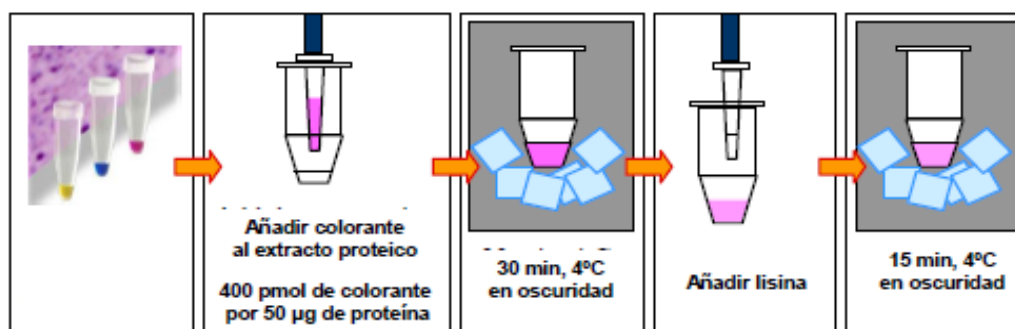


Figura 3. Marcaje de las muestras con fluorocromos.

Electroforesis bidimensional

Primera dimensión

En la primera dimensión, el gradiente de pH inmovilizado se encuentra presente en una tira seca que contiene una matriz de gel de poliacrilamida donde el gradiente de pH se ha generado mediante anfólitos. Esta tira debe hidratarse para poder trabajar con ella.

Se usaron tiras IPG (Immobilized pH gradients) de pH entre 3 y 11 no lineal (*Immobiline™ DryStrip*, 18 cm, GE Healthcare) que se rehidrataron sin la muestra, con 340 µL de solución de hidratación (8M urea, 4% CHAPS, 13 mM DTT, 1% anfolitos, trazas azul de bromofenol) entre 12 y 20 horas, cubriéndose con aceite mineral en la bandeja de rehidratación (*Immobiline DryStrip Reswelling Tray*, GE Healthcare) (hidratación pasiva). Posteriormente, las muestras (150 µg) en las que se incluía muestra “pool” biofilm, muestra “pool” planctónico y estándar interno, se cargaron mediante pocillo (*Ettan IPGphor Cup Loading Manifold*, GE Healthcare). Para ello, a las muestras se les añadió tampón de carga 2x (8M urea, 4% CHAPS, 130 mM DTT, 2% anfolitos), se dejó actuar 10 min y tras centrifugar las muestras, éstas se cargaron en las tiras IPG rehidratadas. El programa de isoelectroenfoque que se utilizó fue el siguiente: 120 V, 1 hora; 300 V, 3 horas; de 300 a 1000 V en gradiente, 6 horas; de 1000 a 8000 V en gradiente, 3 horas; 8000 V, 7.5 horas; 500 V, 10 horas.

Equilibrado tiras

Después de la primera dimensión, tiene lugar el equilibrado de las tiras. Este paso de equilibrado satura la tira de gradiente con el sistema de tampón SDS que se requiere para la separación en la segunda dimensión. Esta solución de equilibrado contiene: 6M urea, 30% glicerol, 50mM Tris-HCl pH 6.8 y 2% SDS. Primero se equilibraron las tiras dejándolas 15 min en agitación suave en solución de equilibrado con 2%DTT y otros 15 min en solución de equilibrado con 2.5% iodoacetamida y azul de bromofenol.

Segunda dimensión

Se prepararon geles de poliacrilamida al 11.5% de acrilamida, sobre los que se depositaron las tiras IPG equilibradas y se sellaron con una solución de tampón de electroforesis con 0.5% de agarosa fundida. La electroforesis se llevó a cabo en el dispositivo *Ettan DaltSix Electrophoresis System* (GE Healthcare) con tampón de electroforesis 1x (25mM Tris, 192mM glicina, 0.2% SDS) en la cubeta inferior y tampón de electroforesis 2x (50mM Tris, 384mM glicina, 0.4% SDS) en la cubeta superior. La electroforesis se realizó a 1W/gel durante 1 hora y hasta un máximo de 17W/gel hasta su finalización.

Escaneado de los geles

Los geles 2D-DIGE se visualizaron en un escáner Typhoon 9400™ (GE Healthcare) con los filtros CyDye. Para la adquisición de las imágenes donde se ven los distintos fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2 se utilizaron las longitudes de onda de excitación/emisión 532 nm/580 nm, 633 nm/670 nm y 480 nm/520 nm, respectivamente, y un tamaño de píxel de 100 µm. Para recortar las imágenes y seleccionar el área de interés se utilizó el programa ImageQuant v5.1 (GE Healthcare). Las imágenes recortadas son importadas a la base de datos de Oracle que posee el software DeCyder v6.5 (GE Healthcare).

Análisis de imagen

El programa DeCyder v6.5 (GE Healthcare) se utilizó para realizar un análisis estadístico de los geles bidimensionales obtenidos mediante el sistema DIGE, a través de los siguientes módulos:

- DIA (*Differential In gel Analysis*): en este módulo se lleva a cabo la co-detección de manchas proteicas y la normalización de las imágenes. Las tres imágenes que corresponden a un gel DIGE (Cy3, Cy5 y Cy2) son analizadas conjuntamente en este módulo. La co-detección de spots se hace conforme al algoritmo del software, donde especificamos que nos detecte el máximo número de manchas posibles. A continuación se hace un filtrado de aquellas manchas que corresponden a fondo. Se eliminan aquellas cuyo volumen sea menor de un valor (volumen estimado del fondo para cada experimento, que en nuestro experimento es 80000), se eliminan posibles artefactos presentes en el gel, y se eliminan y/o incluyen algunas manchas de forma manual.

- BVA (*Biological Variation Analysis*): con este módulo se realiza el emparejamiento de las manchas de todas las réplicas. Los datos obtenidos en el módulo DIA se utilizan en este nuevo módulo, que tiene en cuenta las réplicas biológicas usadas en el proyecto. En primer lugar, se definen los grupos que componen el experimento (Planctónico y Biofilm) y en cada uno de ellos se incluye la imagen que corresponde a cada réplica, según el diseño experimental.

Filtro estadístico de los datos

El tratamiento estadístico de los datos, se realiza en el mismo módulo BVA. Tras el emparejamiento, se calcula la media (en las réplicas de cada condición) del ratio (respecto al Estándar interno, Cy3/Cy2 o Cy5/Cy2) de cada una de las manchas y se hace la comparación, calculando el ratio y el p valor con test de Student's no pareado (aplicando la corrección FDR) de cada uno de los spots.

Las condiciones para establecer una proteína como diferencial fueron que estuviera presente en el 100% de los geles procesados, que tuviera una variación de

la abundancia de ± 1.5 (media del ratio) y un t-Test menor de 0.05 o un ANOVA de dos factores menor de 0.05.

Identificación de las proteínas diferenciales

Tinción de geles con Coomassie coloidal

Para identificar las proteínas diferenciales, se tiñeron los geles bidimensionales con el método de Coomassie coloidal. Este método es compatible con la identificación de proteínas por espectrometría de masas. Los pasos a desarrollar son los siguientes: los geles se fijaron con solución de fijación (50% etanol, 2% ácido fosfórico) un mínimo de 3 horas, tras lo que se hicieron tres lavados con agua MilliQ de 10 min cada uno para eliminar la solución de fijación. Los geles se dejaron agitándose en una solución de 17% sulfato amónico, 3% ácido fosfórico y 33% metanol durante una hora, tras lo cual se les añadió una solución de 5 mL de Coomassie Blue G-250 (Fluka, St. Louis, MO, EE.UU) al 6.6% en metanol y se dejó en agitación durante toda la noche. Después se destiñeron con sucesivos lavados con agua MilliQ hasta quedar visibles las manchas proteicas.

Identificación de proteínas

Las proteínas o spots diferenciales visualizadas en los geles bidimensionales teñidos con Coomassie coloidal fueron recortadas de la acrilamida, digeridas con tripsina y los péptidos resultantes de la digestión fueron separados e identificados por espectrometría de masas. Todo este proceso se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica de la UCM.

Identificación por huella peptídica

La identificación de las proteínas por huella peptídica se realizó con el motor de búsqueda MASCOT v2.3 a través del software Global Protein Server (GPS) v3.6

(ABSCIEX), en la base de datos con los siguientes parámetros de búsqueda: carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metioninas como modificación variable, tolerancia de error de masa para los péptidos 50 ppm y un punto de corte perdido para la tripsina.

Las proteínas identificadas superan la puntuación estimada en cada caso por MASCOT con un valor significativo de p valor <0.05.

Como resultado de este primer análisis de masas se obtuvo un espectro MS, y esta huella peptídica de la proteína se utilizó para su identificación en la base de datos. Las proteínas que no se identificaron de forma concluyente por huella peptídica fueron susceptibles de análisis MS/MS o fragmentación de péptidos. Así, en el espectro MS se seleccionaron de 1 a 4 péptidos precursores con buena intensidad y separados de otros péptidos como mínimo en ± 4 Da (ventana de Masa) para ser aislados, cada uno de ellos en un análisis independiente, en una cámara y fragmentados por colisión con gas atmosférico (Collision Induced Dissociation, CID) con el método de operación de 1Kv ion reflector en modo positivo. Con los espectros MS/MS obtenidos de cada uno de los precursores fragmentados se realizó la búsqueda de la proteína en las bases de datos.

Identificación por huella peptídica combinada con MS/MS

Los parámetros de búsqueda fueron los mismos utilizados en la identificación por huella peptídica a excepción de la tolerancia del error para la masa del precursor que en este caso fue de 80 ppm, y la tolerancia en las masas de los fragmentos (MS/MS) de 0.3 Da.

El péptido identificado supera la puntuación individual del ion que determina MASCOT como un valor significativo de p valor <0.05.

Resultados

Desarrollo del biofilm y el cultivo planctónico

Debido a la complejidad en el estudio de la expresión diferencial de proteínas bacterianas presentes en el biofilm y en células planctónicas mediante herramientas proteómicas basadas en geles bidimensionales, se procedió a la formación de dicho biofilm pero generado con una sola especie bacteriana (monoespecie) con la bacteria periodontopatógena *F. nucleatum*. Para ello se puso a punto la formación del biofilm (concentración de células y días de incubación empleados). Primero, se ensayaron las concentraciones de 10^6 y 10^7 y 10^8 ufc/mL de suspensión bacteriana en fase exponencial crecida en medio BHI modificado; y los biofilms se generaron sobre estos slides a los tiempos de incubación de 24, 48 y 72 horas en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Se comprobó por CLSM (Microscopia Laser Confocal - Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM, por sus siglas en inglés) (Figura 4) y mediante análisis por cultivo bacteriano, que la concentración óptima era de 10^7 ufc/mL y el periodo óptimo de incubación era de 24 horas. En el caso de las células en estado planctónico se realizaron las mismas comprobaciones y se concluyó que la concentración de 10^7 ufc/mL y el tiempo de 24 horas eran los óptimos para la formación del biofilm en esta bacteria.

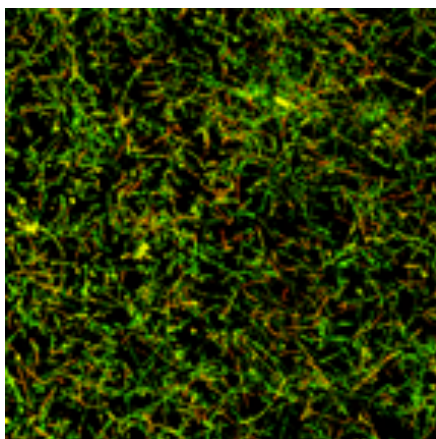


Figura 4. Imagen de Microscopia Confocal perteneciente a un biofilm de *F. nucleatum* (10^7 ufc/mL) de 24 horas de incubación sobre slide cubierto de hidroxiapatita.

Estudio de la expresión diferencial

Para la realización del ensayo, se obtuvieron 108 experimentos independientes llevados a cabo en 108 días distintos en los que se comparaba biofilm vs. planctónico en las mismas condiciones. Toda la metodología se realizó de la misma forma para ambos estados (biofilm y planctónico). La recuperación de las bacterias, la extracción proteica, la limpieza y la solubilización de las proteínas se hizo como se ha descrito en Materiales y Métodos. Tras llevar a cabo la cuantificación, se observó que en el caso de las muestras de biofilm no se encontraba mucha cantidad de proteína, por lo que sería necesario hacer “pooles” o grupos de muestras para obtener la cantidad necesaria de proteína. Aunque en el caso de las células planctónicas sí que existía suficiente cantidad de proteína, sería necesario realizar también los mismos “pooles” para que la comparación entre biofilm-célula planctónica fuese la correcta. Los 108 experimentos independientes se agruparon en 4 pooles distintos que corresponderían a 4 réplicas biológicas.

Como se ha indicado anteriormente en Material y Métodos, tras el proceso de cuantificación, se realizó un gel de control de carga para comprobar que no existía

ningún error en la cuantificación. Según se observa en la Figura 5, las cuatro muestras correspondientes a los “pooles” de biofilm y las cuatro muestras correspondientes a los “pooles” de planctónico tenían una cantidad igual, y por tanto, la cuantificación era correcta.

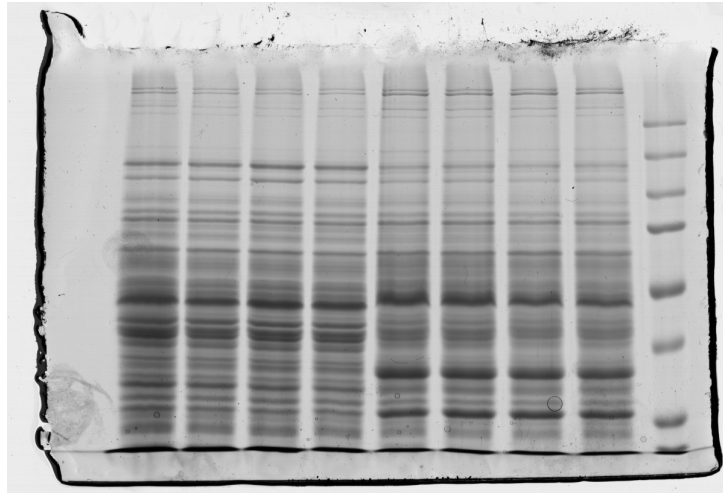


Figura 5. Gel SDS-PAGE al 10% correspondiente al control de carga

Para comprobar que las muestras estaban limpias, sin ningún tipo de contaminación que pudiese interferir en el marcaje con los fluorocromos y en la separación de las proteínas, se realizó un gel bidimensional para muestras biofilm y otro para muestras planctónico, en el que se cargó una cantidad de proteína (150 μ g) en la que estaba presente de forma equimolecular los 4 “pooles” correspondientes a cada uno de los estados (planctónico-biofilm) (Figura 6A y 6B).

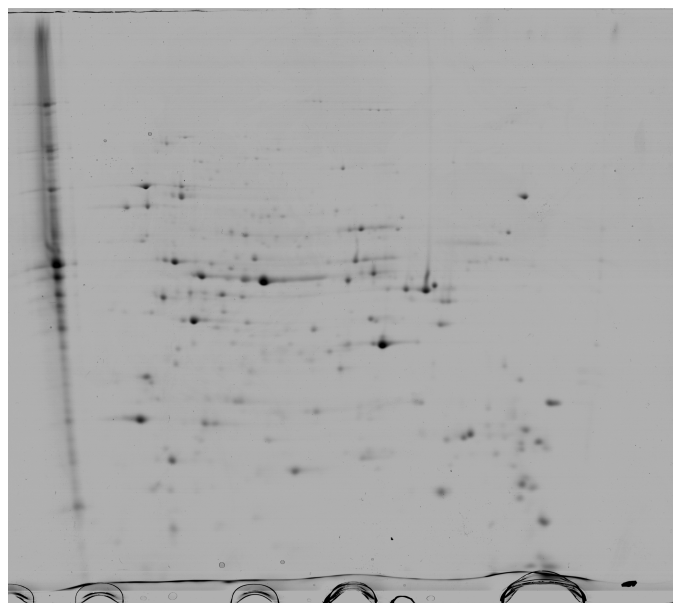


Figura 6A. Imagen correspondiente a un gel bidimensional teñido con Coomassie coloidal de muestra de células planctónicas de *F. nucleatum*.

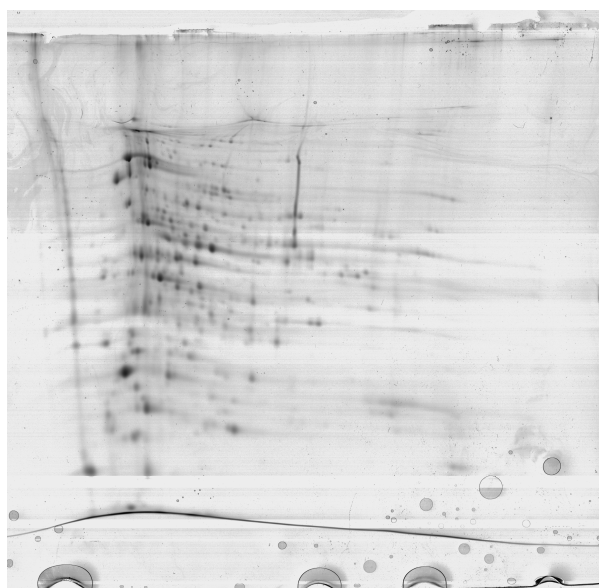


Figura 6B. Imagen correspondiente a un gel bidimensional teñido con Coomassie coloidal de muestra de biofilm de *F. nucleatum*.

Después del marcaje con los fluorocromos y la electroforesis bidimensional, se realizó el escaneado de los geles con un escáner Typhoon 9400™ (GE Healthcare). Cada gel corresponde a muestra biofilm+ muestra planctónico+ estándar interno (Figura 7).

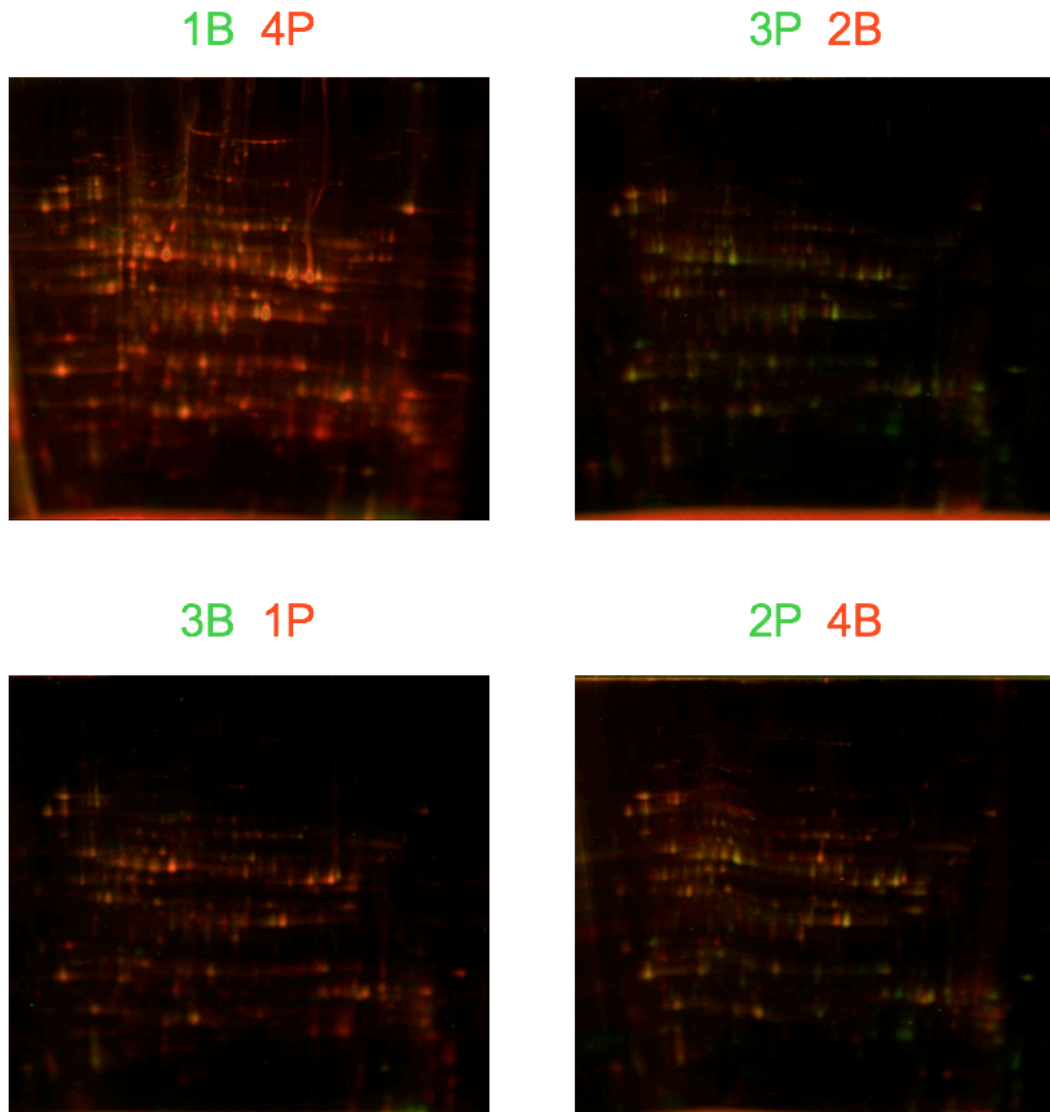


Figura 7. Imágenes correspondientes a los 4 geles DIGE™ escaneados con el escáner Typhoon 9400™ (GE Healthcare).

El programa DeCyder v6.5 (GE Healthcare) se utilizó para realizar un análisis de los geles bidimensionales obtenidos mediante el sistema DIGE. Debido a que uno de los geles interfería en los resultados, se suprimió este gel del estudio y se procedió con el análisis. Se generaron 3 “workspaces DIA” (Differential In gel Analysis) independientes correspondientes a los 3 geles DIGE que se han empleado para este experimento con *F. nucleatum*. Los nombres de estos workspaces y el total de manchas detectadas en cada uno de los geles se resumen en la Tabla 1 (columna: DIA Ws Name y No.of Spots). Distribución del BVA (*Biological Variation Analysis*) queda reflejada en la Tabla 1 en columna Group y el número de manchas emparejadas en cada gel en la columna Matched.

La imagen del gel 522 STANDARD CY2 se utiliza como gel “Master”, sobre el que se realiza el emparejamiento de las manchas proteicas de todas las imágenes que componen el proyecto. Tras realizar el emparejamiento de las manchas de forma automática, se repasa y/o modifica aquellos emparejamientos que no se hayan realizado correctamente, de forma manual.

No.	Status	Image	DIA Ws Name	Label	No.of Spots	Matched	Function	Group
		19 STANDARD						
1	Matched	CY2.gel	19	Cy2	818	627	A	Standard
2	Matched	19 Cy3.gel	19	Cy3	818	627	A	PLANCTONICO
3	Matched	19 Cy5.gel	19	Cy5	818	627	A	BIOFILM
		521 STANDARD						
4	Matched	CY2.gel	521	Cy2	798	614	A	Standard
5	Matched	521 Cy3.gel	521	Cy3	798	614	A	BIOFILM
6	Matched	521 Cy5.gel	521	Cy5	798	614	A	PLANCTONICO
		522 STANDARD						
7	Master	CY2.gel	522	Cy2	928	928	M, A	Standard
8	Matched	522 Cy3.gel	522	Cy3	928	928	A	PLANCTONICO
9	Matched	522 Cy5.gel	522	Cy5	928	928	A	BIOFILM

Tabla 1. Resumen de los datos obtenidos tras el análisis con el módulo DIA y con el módulo BVA.

Los resultados de proteínas que se expresan diferencialmente son los siguientes: un total de 68 manchas proteicas cumplieron estas consideraciones.

Los datos correspondientes a las proteínas de interés están resumidos en la siguiente tabla (Tabla 2):

Pos.	Master No.	Appearance	Biofilm / Planctonico		1-ANOVA
			T-test	Av. Ratio	
1	15	9 (9)	0.015	2.41	0.015
2	65	9 (9)	0.00051	-6.07	0.00051
3	70	9 (9)	0.0014	-2.67	0.0014
4	72	9 (9)	0.00065	-2.64	0.00065
5	88	9 (9)	4.40E-05	-2.8	4.40E-05
6	89	9 (9)	0.0032	-2.07	0.0032
7	104	9 (9)	7.40E-03	-3.17	7.40E-03
8	119	9 (9)	0.0017	-3.21	0.0017
9	121	9 (9)	0.00085	-1.63	0.00085
10	122	9 (9)	0.01	-1.72	0.01
11	201	9 (9)	0.0075	-1.64	0.0075
12	208	9 (9)	0.0055	-1.56	0.0055
13	213	9 (9)	0.0026	-2.27	0.0026
14	214	9 (9)	0.015	-1.55	0.015
15	258	9 (9)	0.0031	-1.75	0.0031
16	279	9 (9)	0.015	-2.52	0.015
17	297	9 (9)	0.023	1.69	0.023
18	306	9 (9)	0.0078	1.86	0.0078
19	308	9 (9)	0.0047	2.16	0.0047
20	340	9 (9)	0.044	1.53	0.044
21	365	9 (9)	0.0062	-1.56	0.0062
22	375	9 (9)	0.024	1.67	0.024
23	381	9 (9)	1.30E-05	1.98	1.30E-05
24	388	9 (9)	0.0023	1.61	0.0023
25	404	9 (9)	0.029	-1.81	0.029
26	408	9 (9)	0.019	-1.56	0.019
27	423	9 (9)	0.031	2.06	0.031
28	478	9 (9)	0.003	-2.42	0.003
29	496	9 (9)	0.0032	-2.15	0.0032
30	512	9 (9)	0.0036	-2.17	0.0036
31	515	9 (9)	0.0069	-1.9	0.0069
32	522	9 (9)	1.40E-04	5.85	1.40E-04
33	525	9 (9)	0.0036	1.88	0.0036
34	543	9 (9)	0.0015	2.17	0.0015
35	545	9 (9)	0.0027	3.94	0.0027
36	555	9 (9)	0.019	-1.64	0.019
37	579	9 (9)	0.0039	-2.64	0.0039
38	583	9 (9)	0.00082	-3.94	0.00082
39	585	9 (9)	1.20E-05	4.09	1.20E-05
40	595	9 (9)	0.0098	-1.89	0.0098
41	606	9 (9)	0.019	1.53	0.019
42	614	9 (9)	0.00018	-3.68	0.00018
43	633	9 (9)	0.0015	1.83	0.0015
44	646	9 (9)	0.00019	5.47	0.00019
45	656	9 (9)	0.0024	3.09	0.0024

46	670	9 (9)	0.00041	3.24	0.00041
47	684	9 (9)	0.0019	2.97	0.0019
48	685	9 (9)	0.0066	3.62	0.0066
49	692	9 (9)	1.80E-05	5.36	1.80E-05
50	697	9 (9)	0.00031	-5.2	0.00031
51	699	9 (9)	0.015	-3.56	0.015
52	710	9 (9)	1.50E-02	2.15	1.50E-02
53	716	9 (9)	0.0025	6.82	0.0025
54	721	9 (9)	0.00043	4.29	0.00043
55	729	9 (9)	0.015	2.29	0.015
56	752	9 (9)	0.0056	2.17	0.0056
57	781	9 (9)	0.0014	3.61	0.0014
58	814	9 (9)	0.0016	1.56	0.0016
59	835	9 (9)	0.0025	6.2	0.0025
60	843	9 (9)	0.0007	7.74	0.0007
61	849	9 (9)	0.0023	1.84	0.0023
62	856	9 (9)	0.00077	4.9	0.00077
63	869	9 (9)	0.0026	3.67	0.0026
64	878	9 (9)	4.10E-02	-1.55	4.10E-02
65	883	9 (9)	0.0013	6.86	0.0013
66	888	9 (9)	0.0023	8.33	0.0023
67	890	9 (9)	0.012	-2.92	0.012
68	894	9 (9)	0.0011	-2.68	0.0011

Tabla 2. Datos de las 68 manchas consideradas como proteínas de interés (POI). La columna de Apperance indica la detección de esa mancha en el total de las imágenes del experimento.

La localización de las POI en el gel 2D, se muestra en la Figura 8:

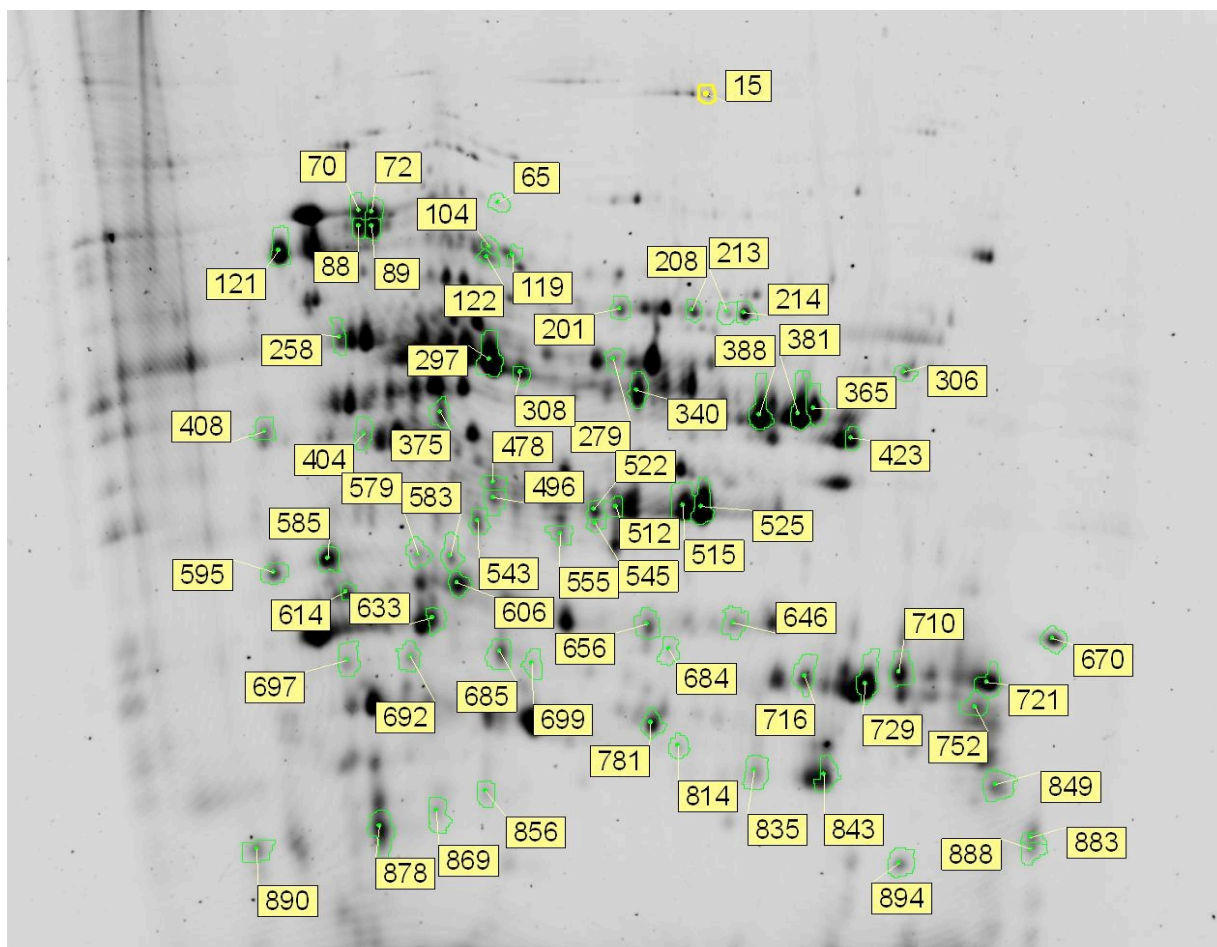


Figura 8. Imagen del Gel Master con las POI (con los n° Master correspondientes).

Identificación de las proteínas de interés (POI)

Se procedió a la identificación de las proteínas de interés arriba marcadas según se ha indicado en Material y Métodos.

En la siguiente tabla (Tabla 3) se muestra la lista de proteínas identificadas: en verde las proteínas que se sobreexpresan en el biofilm y en naranja las proteínas que se reprimen en el biofilm.

Pos.	Master No.	Biofilm / Planctónico		1-ANOVA	Function	GI accession
		T-test	Av. Ratio			
1	15	0.015	2.41	0.015	pyruvate:ferredoxine (flavodoxin oxidoreductase)	355370490
2	65	0.00051	-6.07	0.00051		
3	70	0.0014	-2.67	0.0014	DnaK (Hsp70) heat shock protein	254303601
4	72	0.00065	-2.64	0.00065	glutaconyl-CoA decarboxylase	254302597
5	88	4.40E-05	-2.8	4.40E-05	glutaconyl-CoA decarboxylase	254302597
6	89	0.0032	-2.07	0.0032	glutaconyl-CoA decarboxylase	254302597
7	104	7.40E-03	-3.17	7.40E-03		
8	119	0.0017	-3.21	0.0017		
9	121	0.00085	-1.63	0.00085	peptidylprolyl isomerase	254302273
10	122	0.01	-1.72	0.01		
11	201	0.0075	-1.64	0.0075	lysine 2,3-aminomutase	254303334
12	208	0.0055	-1.56	0.0055	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	355372904
13	213	0.0026	-2.27	0.0026	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	355372904
14	214	0.015	-1.55	0.015	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	355372904
15	258	0.0031	-1.75	0.0031	phosphopyruvate hydratase	254303536
16	279	0.015	-2.52	0.015	NAD-specific glutamate dehydrogenase	34764006
17	297	0.023	1.69	0.023	electron transfer flavoprotein alpha subunit	254303809
18	306	0.0078	1.86	0.0078	glutamate dehydrogenase	34764006
19	308	0.0047	2.16	0.0047	electron transfer flavoprotein alpha subunit	254303809
20	340	0.044	1.53	0.044	acetate kinase	254302983
21	365	0.0062	-1.56	0.0062	porin FomA	254303326
22	375	0.024	1.67	0.024	electron transfer flavoprotein alpha subunit	254303809
23	381	1.30E-05	1.98	1.30E-05	acetyl-CoA acetyltransferase	254304092
24	388	0.0023	1.61	0.0023	acetyl-CoA acetyltransferase	254304092
25	404	0.029	-1.81	0.029	elongation factor EF1B	254303393
26	408	0.019	-1.56	0.019		
27	423	0.031	2.06	0.031	butyryl-CoA dehydrogenase	355371183
28	478	0.003	-2.42	0.003	transketolase	254302700
29	496	0.0032	-2.15	0.0032	pyridoxine biosynthesis	254303958
30	512	0.0036	-2.17	0.0036	cysteine synthase	254303900
31	515	0.0069	-1.9	0.0069	cysteine synthase	254303900
32	522	1.40E-04	5.85	1.40E-04	fructose-bisphosphate aldolase	254302735
33	525	0.0036	1.88	0.0036	cysteine synthase	254303900
34	543	0.0015	2.17	0.0015	hypothetical protein FNP_1523	254303862
35	545	0.0027	3.94	0.0027	fructose-bisphosphate aldolase	254302735
36	555	0.019	-1.64	0.019	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	254303151
37	579	0.0039	-2.64	0.0039	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	254303150
38	583	0.00082	-3.94	0.00082	electron transfer flavoprotein alpha subunit	254303809
39	585	1.20E-05	4.09	1.20E-05	elongation factor P	19704055
40	595	0.0098	-1.89	0.0098	ABC superfamily ATP binding cassette transporter binding	254302678
41	606	0.019	1.53	0.019	PduB propanediol utilization protein	254302068
42	614	0.00018	-3.68	0.00018	hypothetical protein FNP_0293	254302665
43	633	0.0015	1.83	0.0015	triose-phosphate isomerase	254304335
44	646	0.00019	5.47	0.00019		
45	656	0.0024	3.09	0.0024	(LexA repressor) possible transcriptional regulator	254302132
46	670	0.00041	3.24	0.00041	ribosomal protein L3	254303420
47	684	0.0019	2.97	0.0019	R-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase activator	254302599
48	685	0.0066	3.62	0.0066	adenylate kinase	254302850
49	692	1.80E-05	5.36	1.80E-05	transcription antitermination protein NusG	254302296
50	697	0.00031	-5.2	0.00031	peroxiredoxin	254302236
51	699	0.015	-3.56	0.015	adenylate kinase	254302850
52	710	1.50E-02	2.15	1.50E-02	hypothetical protein FNP_0078	254302455
53	716	0.0025	6.82	0.0025	propanediol dehydratase medium subunit	254302069
54	721	0.00043	4.29	0.00043	ABC superfamily ATP binding cassette transporter binding	254303634
55	729	0.015	2.29	0.015	hypothetical protein FNP_2425	254302369
56	752	0.0056	2.17	0.0056	amino acid ABC superfamily ATP binding cassette transporter binding	254302964
57	781	0.0014	3.61	0.0014	hypothetical protein FNP_0229	254302602
58	814	0.0016	1.56	0.0016	hypothetical protein FNP_1719	254304050
59	835	0.0025	6.2	0.0025	hypothetical protein FNP_0718	254303079
60	843	0.0007	7.74	0.0007	hypothetical protein FNP_0718	254303079
61	849	0.0023	1.84	0.0023	ribosomal protein L10	254302293
62	856	0.00077	4.9	0.00077	protein-N-(pi)-phosphohistidine-sugar phosphotransferase	254303269
63	869	0.0026	3.67	0.0026	peptidylprolyl isomerase	254302755
64	878	4.10E-02	-1.55	4.10E-02	hypothetical protein FNP_0283	254302656
65	883	0.0013	6.86	0.0013		
66	888	0.0023	8.33	0.0023		
67	890	0.012	-2.92	0.012		
68	894	0.0011	-2.68	0.0011	OmpW possible outer membrane protein	254303591

Tabla 3. Lista de proteínas identificadas

DISCUSIÓN

Las células bacterianas pueden crecer formando biofilms o en estado de vida libre planctónico y existe evidencia científica sobre el distinto comportamiento entre bacterias de la misma especie viviendo de forma planctónica y formando biofilm (Keller, 2009), sobre todo en cuanto a su expresión proteica. Sin embargo, en bacterias orales esta evidencia es escasa. En este estudio, cuando se comparó *F. nucleatum* formando biofilm frente a cuando está en estado planctónico, se observaron 68 spots que se expresaban diferencialmente. De estos 68 spots, 33 se sobreexpresaban cuando estaba en estado biofilm y 26 se reprimían, como se ve en la Tabla 3. Tras recortar los spots e identificar las proteínas se observó lo siguiente: 26 proteínas se sobreexpresaban y 18 se reprimían cuando se encontraban en estado biofilm. Estas diferencias se deben a que:

- i) sólo se han recortado 60 spots de los 68 diferenciales (las 8 manchas restantes no se han podido recortar debido a la escasa cantidad de proteína);
- ii) en varios casos, diferentes manchas proteicas corresponden a isoenzimas de la misma proteína;
- iii) en otros casos, dos spots con diferente masa molecular pertenecen a la misma proteína. Esto último se debe a que si una proteína sufre un procesamiento y se fragmenta, va a dar lugar a dos manchas con tamaños distintos (la de mayor tamaño corresponde a la proteína sin procesar y la de menor tamaño a la proteína procesada).

En rasgos generales, las proteínas diferenciales identificadas en este trabajo, siguen el mismo patrón que lo publicado en otros estudios de expresión diferencial de proteínas de biofilm de *F. nucleatum* (Chew y cols., 2012). Es decir, las proteínas

que se producen diferencialmente en las células del biofilm se asocian con enzimas metabólicas, transporte y función desconocida (Chew y cols., 2012).

Respecto a las proteínas implicadas en el metabolismo, se ha observado que algunas se reprimen en estado biofilm, y estos resultados siguen el mismo patrón descrito por otros autores (Rathsam y cols., 2005; Donlan y cols., 2002). Esto se debe a que, en esta forma de crecimiento, las bacterias presentan un estado metabólicamente menos activo. Pero también se ha encontrado que otras proteínas de metabolismo se sobreexpresan. Esto puede deberse a que *F. nucleatum* tiene un metabolismo algo diferente respecto a otras bacterias periodontopatógenas (Chew y cols., 2012): esta bacteria tiene la capacidad de catabolizar tanto azúcares como aminoácidos como fuente de energía (Rogers y cols., 1991; Takahashi y cols., 2002) en contraste con otros patógenos periodontales como *P. gingivalis* (Shah y cols., 1997) y *Treponema denticola* (Seshadri y cols., 2004); y este metabolismo algo diferente de *F. nucleatum* provoque esas diferencias en la expresión proteica.

Otro grupo de proteínas que se sobreexpresan en la forma de crecimiento de biofilm son los transportadores de tipo ABC (ATP-binding cassette). Éstas son proteínas de membrana, fundamentales en muchos procesos biológicos como la división celular, el control del volumen de la célula y el control de las sustancias que entran y salen por las membranas celulares (Young y cols., 1999). Estos resultados pueden ser muy relevantes por el papel que poseen estas proteínas en la resistencia de la bacteria a los antibióticos (Al-Haroni y cols., 2008).

Un grupo de proteínas que mayoritariamente se sobreexpresan en el biofilm, son proteínas de función desconocida denominadas “hypothetical proteins”. Estos datos coinciden con lo descrito por otros autores (Chew y cols., 2012). El análisis y la

búsqueda de la implicación de estas proteínas en el biofilm, nos pueden dar información sobre el papel de esta bacteria en esta forma de crecimiento.

Otra proteína que se sobreexpresa en el biofilm y que puede tener interés es NusG. Esta proteína puede ser utilizada como marcador de *F. nucleatum* (Castellarin y cols., 2012) y puede ser relevante para el desarrollo de nuevos instrumentos diagnósticos, no solo para la periodontitis sino también para otras enfermedades asociadas a la presencia de esta bacteria (Huang y cols., 2016).

CONCLUSIÓN

Se observaron 68 spots proteicos de *F. nucleatum* que se expresan diferencialmente en estado biofilm respecto al estado planctónico y fueron identificadas 26 proteínas que se sobreexpresan y 18 que se reprimen. La mayoría de éstas se asocian con enzimas metabólicas, transporte y función desconocida, resultado acorde con la literatura.

El cambio de expresión proteica asociado al desarrollo en estado biofilm puede permitir a *F. nucleatum* adaptarse y competir con éxito en la cavidad oral. El estudio de estas proteínas diferenciales bacterianas nos va a permitir encontrar dianas para futuras terapias que permitan bloquear o mermar la incorporación de esta bacteria a la placa bacteriana.

Es necesario validar funcionalmente algunas de estas proteínas, para poder aclarar el papel de éstas en la virulencia de la bacteria y su uso potencial en el diagnóstico y el tratamiento de la periodontitis.

Bibliografía

- Al-Haroni, M. et al., (2008). Proteomic analysis of ampicillin-resistant oral *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiology and Immunology*; 23(1), pp.36-42.
- Arciola, C.R. et al., (2005). Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*; 26(33), pp.6530-6535.
- Armitage, G.C. (1995). Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontology* 2000; 7, 39-53.
- Bachrach, G., Ianculovici, C., Naor, R., Weiss, El., (2005). Fluorescence based measurements of *Fusobacterium nucleatum* coaggregation and of fusobacterial attachment to mammalian cells. *FEMS Microbiology Letters*; 248,235-240.
- Baumgartner, J. C., Jr, Falker, W.A., and Beckerman, T., (1992). Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiology and Immunology*; 7, 253-256.
- Bolstad, A. I., Jensen, H. B., and Bakken, V., (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of Clinical Microbiology*; 9, 55-71.
- Bradshaw, D. J., Marsh, P. D., (1998). Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities *in vitro*. *Caries Research*; 32, 456-462.
- Caldwell, D.E., Wolfaardt, G.M., Korber, D.R. & Lawrence J.R., (1997). Do bacterial communities transcend Darwinism? In: Jones, J. G., ed. *Advances in Microbial Ecology*; Vol. 15. New York: Plenum, pp. 105-191.
- Castellarin, M., Warren, R. L., Freeman, J. D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Strauss, J., Barnes, R., Watson, P., Allen-Vercoe, E. et al., (2012). *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Research*; 22, 299-306.
- Chaushu, S., Wilensky, A., Gur, C., Shapira, L., Elboim, M., Halftek, G., Polak, D., Achdout, H., Bachrach, G., Mandelboim, O., (2012). Direct recognition of *Fusobacterium nucleatum* by the NK cell natural cytotoxicity receptor NKp46 aggravates periodontal disease. *PLoS Pathogens*; 8, e1002601.

- Chew, J. et al., (2012). A proteomic investigation of *Fusobacterium nucleatum* alkaline-induced biofilms. *BMC Microbiology*; 12, p.189.
- Chung, S. Y., Song, K. B., Lee, S. G. & Choi, Y. H., (2011). The strength of age effect on tooth loss and periodontal condition in Korean elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics*; 53, e243-e248.
- Copenhagen-Glazer, S., Sol, A., Abed, J., Naor, R., Zhang, X., Han, Y. W., & Bachrach, G., (2015). Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* is a galactose-inhibitable adhesin involved in coaggregation, cell adhesion, and preterm birth. *Infections on and Immunity*; 83, 1104-1113.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284; 1318-1322.
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W., (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*; 15(2), pp.167-193.
- Dzink, J.L., Socransky, S.S. & Haffajee, A.D., (1988). The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*; 15(5), pp.316-323.
- Dzink, J.L. et al., (1985). Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *Journal of Clinical Periodontology*; 12(8), pp.648-659.
- Eke, P.I., Page, R.C., Wei, L., Thornton-Evans, G., Genco, R.J., (2012). Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*; 39, 1449-1454.
- Frencken, J. E., Sharma, P., Stenhouse, L., Green, D., Lavery, D., and Dietrich, T., (2017). Global Epidemiology of Dental Caries and Severe Periodontitis - a Comprehensive Review. *Journal of Clinical Periodontology*; 44 Suppl 18 (March): S94-105.
- Guo, L., He, X., & Shi, W., (2014). Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Frontiers in Microbiology*; 5, 328.
- Gupta, S., Ghosh, S.K., Scott, M.E., Bainbridge, B., Jiang, B., Lamont, R.J., McCormick, T.S., Weinberg A., (2010). *Fusobacterium nucleatum*-associated beta-defensin inducer (FAD-I): identification, isolation, and functional evaluation. *Journal of Biological Chemistry*; 285, 36523-36531.

- Haffajee, A.D., Teles, R.P. & Socransky, S.S., (2006). The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology* 2000, 42(1); pp.219-258.
- Halliman, D. G., Ahearn, D. G., (2004). Relative susceptibilities to vancomycin and quinupristin-dalfopristin of adhered and planktonic vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible coagulase-negative staphylococci. *Current Microbiology*; 48, 214- 218.
- Han, Y.W., (2011). *Fusobacterium nucleatum* interaction with host cells. In: Kolenbrander, P., editor. Chapter 15; In: *Oral Microbial Communities: Genomic Inquiry and Interspecies Communication*, ASM Press.
- Han, Y.W., Redline, R.W., Li, M., Yin, L., Hill, G.B., McCormick T.S., (2004). *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infection and Immunity*; 72, 2272-2279
- Han, Y.W., Shi, W., Huang G.T., Kinder Haake, S., Park, N.H., Kuramitsu, H., Genco, R.J., (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infection and Immunity*; 68,3140-3146.
- Herrera, D. et al., (2000). The periodontal abscess (I). Clinical and microbiological findings. *Journal of Clinical Periodontology*; 27(6), pp.387-394.
- Hofstad, T., (1981). The genus *Fusobacterium*, p. 1464-1467. In M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel (ed.), *The procaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Springer Verlag, New York.
- Hola, V., Ruzicka, F., Votava, M., (2004). Differences in antibiotic sensitivity in biofilm-positive and biofilm-negative strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Epidemiology Microbiology Immunology*; 53, 66-69.
- Huang, S. et al., (2016). Rapid detection of *nusG* and *fadA* in *Fusobacterium nucleatum* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Medical Microbiology*; 65(8), pp.760-769.
- Jekinson, H.F., (2014). Introduction to Fundamental Concepts of Oral Microbial Ecology, Chapter 1, In: *Richard J. Lamont, George N. Hajishengallis, Howard F. Jenkinson -Oral Microbiology and Immunology-2o ed*, ASM Press, pp 20-23.

- Jorth, P., Turner, K. H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., & Whiteley, M., (2014). Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio*, 5, e01012-e01014.
- Kaplan, C. W., Lux, R., Haake, S. K., & Shi, W., (2009). The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. *Molecular Microbiology*; 71, 35-47.
- Kaplan, C.W., Ma, X., Paranjpe, A., Jewett, A., Lux, R., Kinder-Haake, S., Shi, W., (2010). *Fusobacterium nucleatum* outer membrane proteins Fap2 and RadD induce cell death in human lymphocytes. *Infection and Immunity*; 78,4773-4778.
- Keller, M., Hettich, R., (2009). Environmental proteomics: a paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 73:62-70.
- Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K., (1998). Skeletal muscle-specific calpain, p94: structure and physiological function. *Biochemical Pharmacology*; 56, 415-420.
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., & Moore, L. V., (1989a). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infection and Immunity*; 57, 3194-3203.
- Kolenbrander, P. E., & Andersen, R. N., (1989b). Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis by lactose and related sugars. *Infection and Immunity*; 57(10), 3204-3209.
- Kolenbrander, P. E., & London, J., (1993). Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*; 175, 3247-3252.
- Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr. Rickard, A.H. et al., (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*; 42, 47-79.
- Kolenbrander, P.E., Palmer, R.J., Jr., Periasamy, S. & Jakubovics, N.S., (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*; 8, 471-480.

- Kolenbrander, P. E., Parrish, K. D., Andersen, R. N., & Greenberg, E. P., (1995). Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infection and Immunity*; 63, 4584-4588.
- Kostic, A.D., Gevers, D., Pedamallu, C.S., Michaud, M., Duke, F., Earl, A.M., Ojesina, A.I., Jung, J., Bass, A.J., Tabernero, J., et al., (2012). Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Research*; 22,292-298.
- Lindhe, J., Hamp S. E. & Loe H., (1975). Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *Journal of Periodontal Research* 10(5): 243-255
- Lindhe, J. and Rylander H., (1975). Experimental gingivitis in young dogs. *Scandinavian Journal of Dental Research*; 83(6): 314-326
- Loe, H., Theilade E. and Jensen S. B., (1965). Experimental Gingivitis in Man. *Journal of Periodontology*; 36: 177-187
- Marsh, P., (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*; 32, 7-15.
- Marsh, P.D. & Bowden, G.H.W., (2000). Microbial community interactions in biofilms. In: Allison, D.G., Gilbert, P, Lappin-Scott, H.M. & Wilson, M., eds. *Community Structure and Co-operation in Biofilms*. Society for Microbiology Symposium 59. Cambridge: *Cambridge University Press*; pp. 167-198.
- Marsh, P.D. & Devine, D.A., (2011). How is the development of dental biofilms influenced by the host? *Journal of Clinical Periodontology*; 38 Suppl 11, 28-35
- Niederman, R., Buyle-Bodin, Y., Lu, B. Y., Robinson, P., & Naleway, C., (1997). Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *Journal of Dental Research*; 76, 575-579.
- Ono, Y., Kakinuma, K., Torii, F., Irie, A., Nakagawa, K., et al., (2004). Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *Journal of Biological Chemistry*; 279, 2761-2771.
- Page, R.C. & Kornman, K.S., (1997). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000*; 14, pp.9-11.

- Papapanou, P.N. et al., (2000). "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *Journal of Periodontology*; 71(6), pp.885-897.
- Park, S.R., Kim, D.J., Han, S.H., Kang, M.J., Lee, J.Y., Jeong, Y.J., Lee, S.J., Kim, T.H., Ahn, S.G., Yoon, J.H., et al., (2014). Diverse Toll-like receptors mediate cytokine production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in macrophages. *Infection and Immunity*; 82,1914-1920.
- Rathsam, C. et al., (2005). Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiology (Reading, England)*; 151(Pt 6), pp.1823-1837.
- Rogers A.H., Zilm P.S., Gully N.J., Pfennig A.L., Marsh P., (1991). Aspects of the growth and metabolism of *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 in continuous culture. *Oral Microbiology and Immunology*; 6(4):250-255.
- Sanz, M., van Winkelhoff, A.J., Working Group 1 of Seventh European Workshop on Periodontology, (2011). Periodontal infections: understanding the complexity--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. In *Journal of Clinical Periodontology*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 3-6.
- Seshadri R., Myers G.S.A., Tettelin H., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Dodson R.J., Davidsen T.M., DeBoy R.T., Fouts D.E., Haft D.H., et al., (2004). Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 101(15):5646-5651.
- Shah H.N., Williams R.A.D., (1987). Utilization of glucose and amino acids by bacteroides intermedius and bacteroides gingivalis. *Current Microbiology*; 15(5):241-246.
- Shapiro, J.A., (1998). Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Reviews of Microbiology*; 52, 81-104.
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith C. and Kent R. L., (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*; 25(2): 134-144
- Socransky, S.S. & Haffajee, A.D., (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology 2000*; 28, 12-55.

- Socransky, S.S., Smith, C. & Haffajee, A.D., (2002). Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*; 29(3), pp.260-268.
- Sorimachi, H., Imajoh-Ohmi, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Ohno, S., et al., (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*; 264, 20106-20111.
- Takahashi, N. & Sato, T., (2002). Dipeptide utilization by the periodontal pathogens porphyromonas gingivalis, prevotella intermedia, prevotella nigrescens and fusobacterium nucleatum. *Oral Microbiology Immunology*; 17(1):50-54.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M., (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*; 1:377-396.
- Van der Velden, U. et al., (2003). Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of Clinical Periodontology*; 30(7), pp.603-610.
- Wilderer, P.A. & Characklis, W. G., (1989). Structure and function of biofilms. In Characklis, W. G., Wilderer, P.A., eds. *Structure and Function of Biofilms*. Chichester, UK: John Wiley, pp. 5-17
- Young, J. & Holland, I.B., (1999). ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1461: 177- 200.
- Zarco, M. F., Vess, T. J., & Ginsburg, G. S., (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases*; 18, 109-120